

REIVINDICACIONES

1. Un vector recombinante de AAV (rAAV) que comprende una cápside y un genoma, en donde dicho genoma comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia codifica la proteína del Factor IX humano, en la que dicho ácido nucleico es al menos 90% idéntico a la SEQ ID NO: 10, codifica la misma proteína del Factor IX humano codificada por la SEQ ID NO: 10 y tiene un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con una secuencia natural que codifica la proteína del Factor IX humano.
2. El vector rAAV de la reivindicación 1, que comprende además un intrón, un elemento de control de expresión, una o más repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno.
3. El vector rAAV de la reivindicación 2, en la que el intrón está dentro de la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano, o en la que el elemento de control de la expresión está operativamente ligado a la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano ITR, o en la que AAV ITR(s) flanquean el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano, o en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno flanquea el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano.
4. El vector rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 2-5 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
5. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 5-10 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
6. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 10-15 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

7. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 15-20 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
8. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 20-25 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
9. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 25-30 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
10. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 30-40 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
11. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 40-55 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.
12. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno está desprovista de cualquier dinucleótido CpG.
13. El vector rAAV cualquiera de las Reivindicaciones 1-12, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana comprende una secuencia con una identidad del 95% o más con la SEC ID NO: 10.
14. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-12, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana comprende las SEC ID Nos: 10, 25 o 26.

15. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-12, en la que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO: 11.
16. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-15, en la que la secuencia del intrón comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO: 17.
17. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-16, en la que el elemento de control de la expresión comprende una secuencia potenciadora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 14.
18. El vector rAAV a de cualquiera de las Reivindicaciones 2-16, en la que el elemento de control de la expresión comprende una secuencia promotora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 15.
19. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-18, en la que la secuencia de la una o más repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 13 y/o SEC ID NO: 20.
20. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-19, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno comprende una secuencia establecida como SEC ID NO: 21.
21. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-20, en la que el elemento de control de expresión comprende un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento o promotor de control de expresión específico de tejido.
22. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-21, en la que el elemento de control de la expresión comprende un elemento que confiere una expresión en el hígado.
23. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-22, en la que el elemento de control de la expresión comprende un promotor α 1-anti-tripsina humano (hAAT) y/o apolipoproteína E (ApoE) HCR-1 y/o Potenciador de HCR-2.
24. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-23, que comprende además una secuencia de poliadenilación localizada en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX humano.

25. El vector rAAV de la Reivindicación 24, en la que la secuencia de poliadenilación se localiza en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor IX humano comprende una secuencia de poliadenilación de bGH.
26. El vector rAAV de la Reivindicación 24, en la que la secuencia de poliadenilación localizada en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX humano comprende una secuencia de poliadenilación que tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados de la misma.
27. El vector rAAV de la Reivindicación 26, en la que la secuencia de poliadenilación comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 19.
28. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-27, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno está localizada en 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.
29. L El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-28, en la que las ITR(s) de AAV flanquean el extremo 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.
30. El vector rAAV de la Reivindicación 29, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno está localizada en 3' de las ITR(s) de AAV que flanquea el extremo 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.
31. El vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 2-30, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno comprende una secuencia de fago lambda.
32. Un plásmido que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-31, que comprende además uno o más orígenes de replicación y/o un ácido nucleico que codifica resistencia a un antibiótico.
33. Un plásmido que comprende la SEC ID NO: 12 o 26.
34. Un vector viral que comprende la secuencia que codifica la proteína FIX humana o el vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4.

35. El vector viral de acuerdo con la Reivindicación 34, en el que dicho vector viral es un vector lenti o adenoviral.

36. El vector viral de acuerdo con la Reivindicación 34, en el que dicho vector viral es un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV).

37. El vector de AAV de la Reivindicación 36, que comprende una secuencia ITR de cualquiera de: serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 AAV.

38. Vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 que tiene un 90% o más de identidad con secuencias AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 VP1, VP2 y/o VP3.

39. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside VP1, VP2 o VP3 seleccionada entre cualquiera de: serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 AAV.

40. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia VP1 que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1, o 1-50 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a la misma; una secuencia VP2 que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2, o 1-50 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a la misma; y/o una secuencia de VP3 que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 3, o 1-50 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a la misma.

41. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202 de la secuencia de la cápside de VP1 establecida como SEC ID NO: 1, o una sustitución de aminoácido de una arginina por una lisina en la secuencia de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 1.

42. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene residuos de cualquiera de los aminoácidos A, V, P o N en

cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202 del conjunto de secuencias de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 1.

43. El vector de AAV de la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 1.

44. El vector de AAV de la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene dos, tres o cuatro de un resto A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 4.

45. El vector de AAV de la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside de VP1 que tiene una identidad del 90% o más con cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-9.

46. El vector de AAV de la Reivindicación 36, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside de VP1 que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-9.

47. Una composición farmacéutica que comprende el vector rAAV de cualquiera de las Reivindicaciones 1-31 y 36-46.

48. La composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 47, que comprende además una cápside vacía de AAV.

49. La composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 48, en la que dicha cápside vacía se selecciona del AAV serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAV11.

50. Un vector de expresión que comprende la SEC ID NO: 11 o la SEC ID NO: 25.

51. El vector de expresión de la Reivindicación 50, que comprende además una secuencia potenciadora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 14.

52. El vector de expresión de la Reivindicación 50, que comprende además una secuencia promotora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 15.

53. El vector de expresión de la Reivindicación 55, que comprende adicionalmente una ITR de AAV2 corriente arriba y/o corriente abajo como se establece en la SEC ID NO: 12 o 26, en el que dicha ITR corriente arriba está posicionada en 5' del potenciador y/o dicha ITR AAV2 corriente abajo está posicionada en 3' de los exones hFIX 2-8 establecidos en la SEC ID NO: 12 o 26.

54. El vector de expresión de la Reivindicación 50, que comprende además una secuencia poliA situada en 3' de los exones hFIX 2-8 como se establece en la SEC ID NO: 12 o 26 y posicionada en 5' de AAV2 ITR.

55. Un vector rAAV que comprende el vector de expresión de cualquiera de las Reivindicaciones 50-54.

56. El vector rAAV de la Reivindicación 55, en el que la secuencia de la cápside comprende una secuencia de la cápside de VP1 que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-9.

57. Un vector AAV recombinante (rAAV) para tratar la hemofilia B, que comprende una cápside y un genoma, en el que dicha cápside comprende una proteína VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4; y en el que dicho genoma es monocatenario y comprende los siguientes elementos en orden de 5' a 3':

- (a) un primer ITR AAV2,
- (b) un elemento de control de la expresión específico de hígado en un enlace operable con
- (c) un ácido nucleico optimizado en codones que codifica una proteína Factor IX Padua humano
- (d) una secuencia de poliadenilación; y
- (e) un segundo AAV2 ITR.

58. El vector rAAV de la Reivindicación 57, en el que

- (a) la secuencia de ácido nucleico de la primera ITR de AAV2 consiste en los nucleótidos 1-141 de la SEC ID NO: 12,

- (b) la secuencia de ácido nucleico de dicho potenciador de ApoE HCR-1 consiste en los nucleótidos 152-472 de la SEC ID NO: 12,
- (c) la secuencia de ácido nucleico de dicho promotor ATT consiste en los nucleótidos 482-878 de la SEC ID NO: 12,
- (d) la secuencia de ácido nucleico de dicho ácido nucleico que codifica la variante de la proteína del Factor IX de Padua humana que comprende al menos un intrón, o una porción del mismo, que consiste en los nucleótidos 908-3731 de la SEC ID NO: 12,
- (e) la secuencia de ácido nucleico de dicha secuencia de poliadenilación consiste en los nucleótidos 3820-4047 de la SEC ID NO: 12; y
- (f) la secuencia de ácido nucleico de dicha segunda ITR de AAV2 consiste en los nucleótidos 4097-4204 de la SEC ID NO: 12.

59. El vector de rAAV de la Reivindicación 58, en el que el genoma comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente a los nucleótidos 1-4204 de la SEC ID NO: 12.

60. Una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico contigua idéntica a la secuencia de ácido nucleico de 1-4204 de la SEC ID NO: 12.

61. La célula huésped de la Reivindicación 60, que comprende además la proteína rep de AAV, la proteína de la cápside de AAV y la(s) proteína(s) auxiliar(es) de adenovirus.

62. La célula huésped de la Reivindicación 61, en la que la proteína de la cápside de AAV comprende la SEC ID N^o: 4, o una secuencia que tiene una identidad del 90% o más con la misma.

63. La célula huésped de la Reivindicación 61, en la que la célula huésped expresa la proteína FIX Padua.

64. Un método para producir un vector rAAV que comprende la secuencia de ácido nucleico de 1-4204 de la SEC ID NO: 12, que comprende cultivar una célula huésped de la Reivindicación 61 en condiciones que permiten el empaquetamiento de la secuencia de ácido nucleico de 1-4204 de la SEC ID NO: 12 en partículas de AAV produciendo de este modo el vector AAV.

65. El método de la Reivindicación 64, que comprende además purificar o aislar el vector de AAV así producido.

66. Un vector rAAV producido mediante el método de la Reivindicación 64.
67. Un vector de AAV aislado o purificado producido por el método de la Reivindicación 65.
68. El vector rAAV de la reivindicación 57, en donde dicha secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido del Factor IX Padua que comprende al menos un intrón, o una porción de este.
69. El vector rAAV de la reivindicación 57 o 58, en donde dicho intrón es Intron A del gen FIX.
70. El vector rAAV de la cualquiera de las reivindicaciones 57, 68 y 69, en donde dicho polipéptido es idéntico a la secuencia de aminoácidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.
71. El vector rAVV de cualquiera de las reivindicaciones 57, 68 -70, en donde dicho elemento de control de expresión específico de hígado comprende un potenciador y promotor.
72. El vector rAVV de cualquiera de las reivindicaciones 57, 68 -71, en donde dicho potenciador es un ApoE HCR-1 y dicho promotor es un promotor AAT.
73. El vector rAAV de las reivindicaciones 1 o 57, en donde dicho ácido nucleico es interrumpido por un intrón.
74. El vector rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 68 y 73 en donde dicho intrón tiene al menos un dinucleótido CpG menos en comparación con un intrón nativo o de tipo natural de contraparte.
75. El vector rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde dicho elemento de control de expresión, repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) o secuencias de polinucleótidos de relleno tienen al menos un dinucleótido CpG menos en comparación con un intrón nativo o elemento de control de expresión de tipo natural, repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno.

76. El vector rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, 21-23 y 57, en donde dicho elemento de control de expresión comprende un promotor y un potenciador.

LAG\LAG\ID-669791\WPC21563